

THESIS

BONN

1967

Die Tetracyclin-Fluoreszenz bei
experimentell erzeugten Tumoren und nicht
geschwulstartigen Organveränderungen
bei Ratten

LANE MEDICAL LIBRARY OF
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR ROAD
PALO ALTO, CALIFORNIA

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Bonn

vorgelegt von

Jose Luis Sierra-Callejas

aus

Bello/Kolumbien

Bonn 1967



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153520_0157

Die Tetracyclin-Fluoreszenz bei
experimentell erzeugten Tumoren und nicht
geschwulstartigen Organveränderungen
bei Ratten

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von
Jose Luis Sierra-Callejas
aus
Bello/Kolumbien

Bonn 1967

Angefertigt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Bonn

Referent: Priv.-Doz. Dr. C. Thomas
Korreferent: Prof. Dr. H. Hamperl

Tag der mündlichen Prüfung: 2. November 1967

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Bonn
Direktor: Professor Dr. H. Hamperl

Die experimentellen Untersuchungen wurden durch die
Deutsche Forschungsgemeinschaft ermöglicht.

Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit

I.) EINLEITUNG und PROBLEMSTELLUNG

II.) METHODIK

1. Tiermaterial
2. Vorbehandlung der Tiere
 - A) Akute Magenentzündungen
 - B) Akute Lebernekrosen
 - C) Chronische Leberveränderungen
 - D) Tumoren im oberen Verdauungstrakt
 - E) Lebercarcinome
 - F) Subcutane Sarkome
3. Tetracyclin-Fluoreszenz
 - A) Pharmakologische und chemische Eigenschaften
 - B) Applikationsart und Dosierung
 - C) Nachweis der Tetracyclin-Fluoreszenz und Dokumentation
 - D) Histologische Untersuchung

III.) EIGENE BEFUNDE

- A) Akute Magenveränderungen nach oraler Applikation von N-Nitroso-N-methylharnstoff (NMH)
- B) Akute Leberveränderungen nach oraler Applikation von Diäthylnitrosamin (DÄNA)
- C) Chronische durch orale Applikation von DÄNA und Thioacetamid hervorgerufene Leberveränderungen
- D) Tumoren im oberen Verdauungstrakt nach oraler Applikation von Dinitrosopiperidin (DNP) und NMH

- E) Lebercarcinome nach oraler Applikation von DÄNA und Thioacetamid (THIOAC.) und durch Äthyl-Äthanolnitrosamin (ÄÄ-NO)
- F) Subcutane Sarkome nach lokaler Applikation von cancerogenen Kohlenwasserstoffen: 1,2-Dimethyl 9,10-Benzanthracen (DMBA) und 3,4-Benzpyren (BP)

IV.) DISKUSSION

- 1. Magen
- 2. Leber
- 3. Tumoren

V.) SCHLUSSFOLGERUNGEN und ZUSAMMENFASSUNG

VI.) ABBILDUNGEN

VII.) LITERATURVERZEICHNIS

I.) Einleitung und Problemstellung:

In den letzten Jahren ist wiederholt der Versuch unternommen worden, durch färbereiche, biochemische oder chemische Reaktionen die bösartigen Tumoren von anderen Krankheiten abzugrenzen. So wurden z.B. Tumoren und tumorverdächtige Organe unter dem UV-Licht makroskopisch und mikroskopisch untersucht, wobei sich herausstellte, daß bestimmte Organe und Gewebe eine Eigen- oder Primär-Fluoreszenz aufweisen, also eine Fluoreszenz, die ohne körperfremde Stoffe entsteht. (Zusammenfassende Darstellung bei HAMPERL und SCHÜMMELFEDER, 1961).

Im Jahre 1924 fand POLICARD bei experimentell erzeugten Hautcarcinomen bei Ratten eine rötliche Fluoreszenz, die später auch bei menschlichen Hauttumoren beobachtet wurde (GOUGEROT und PATTE, 1939). 1960 und 1961 stellte GHADIALLY fest, daß diese Rot-Fluoreszenz auf das Vorhandensein von Protoporphyrin zurückzuführen ist, welches durch Bakterien (*Staphylococcus pyogenes* und *Escherichia coli*), die in den ulcerierten Hauttumoren häufig vorkommen, erzeugt bzw. freigesetzt wurde.

RALL und Mitarb. (1957), die ebenfalls verschiedene menschliche Tumoren unter dem UV-Licht untersuchten, entdeckten bei einem Mammacarcinom eine eigentümliche goldgelbe Fluoreszenz. In der Anamnese fanden sie, daß man diese Patientin vor der Mammaamputation mit Tetracyclin behandelt hatte, welches - wie sich später herausstellte - Ursache dieser Fluoreszenz war.

Bei dieser Tetracyclin-Fluoreszenz handelt es sich um eine Sekundär-Fluoreszenz, d.h. der fluoreszierende Stoff wird nicht endogen erzeugt, sondern dem Organismus zugeführt.

Inzwischen sind zahlreiche Stoffe bekannt geworden, die diese Eigenschaft sowohl in vivo als auch in vitro aufweisen. Einige sind zur makroskopischen und mikroskopischen Krebsdiagnostik herangezogen worden; um nur zwei zu nennen: das Fluorescein (MOORE, 1947) und das Acridinorange (KERN et al., 1961; BERTALANFFY, 1960, 1963). Auch das Tetracyclin ist in den letzten Jahren zahlreichen Patienten verabreicht worden mit der Absicht, durch eine Tetracyclin-Fluoreszenz insbesondere die Magenkrebs-Diagnose zu sichern (sog.KLINGER-KATZ-Test). Das Ergebnis dieser Untersuchungen verschiedener Autoren stellten TOMENIUS und LINDKVIST zusammen (siehe Tabelle 1).

TABELLE 1

	Klinger-Katz Test				
	+	-	Total	% +	% -
Magencarcinome (Oesoph. Carcinome)	183	39	222	82	18
Magen oder Duodenalgeschwüre	25	219	244	10	90
Gastritis Perforierende Anämien	0	45	45	0	100
andere gutartige Fälle	12	287	299	4	96
Gesamtzahl gutartige Fälle	37	546	583	6	94
Gesamtzahl aller Fälle			805		

Aus ihr geht hervor, daß diese Resultate sehr unterschiedlich sind. Während einige Verfasser bei dieser Methode eine sehr hohe diagnostische Treffsicherheit feststellten (BERK und KANTOR, 1962), wurde diese von anderen nicht bestätigt (s.Tabelle 2). Auch Tierversuche, die vorwiegend mit Impftumoren durchgeführt wurden, fielen unterschiedlich aus (s.Tabelle 3).

Am Beispiel der autochthonen Tiertumoren soll deshalb in der vorliegenden Arbeit der Versuch unternommen werden, den diagnostischen Wert der Tetracyclin-Fluoreszenz zu prüfen. Es soll geklärt werden, wie sich die Tetracyclin-Fluoreszenz bei folgenden Organveränderungen verhält:

- A) akute Nekrosen und Entzündungen im Magen und
in der Leber,
- B) chronische Entzündungen und Fibrosen in der
Leber,
- C) gut- und bösartige Tumoren im oberen Verdauungs-
trakt, im subcutanen Gewebe und in der Leber.

TABELLE II

Tetracyclin-Fluoreszenz bei verschiedenen menschlichen Erkrankungen

Autoren Jahr	Diagnose	Fälle	Tetrac. Appl.	Fluoreszenz		
				+	-	?
Rall et al. 1957	Carcinome Leukämien	2	p.o.	2	0	0
		2		0	2	0
Mc.Leay 1958	Carcinome	10	p.o.	10	0	0
	Osteogenes Sarkom	1	i.v.	1	0	0
	Schilddrüsenadenome	2		0	2	0
	Bronchiektase	1		0	1	0
	Fibrös-cyst.Mastopathie	2		0	2	0
	Gutartige Magenulcera	2		0	2	0
	Rektumpolyp	1		0	1	0
	Hautulcera	2		0	2	0
Vassar et al. 1959	Carcinome	9	p.o.	9	0	0
	Chronische unspezifische Hautulcera	5		5	0	0
Phillips et al. 1960	Carcinome	31	p.o.	18	11	2
	Sarkome	3	i.m.	2	1	0
	Hepatom	1	i.v.	1	0	0
Mc.Leay und Walske 1960	Osteogene Sarkome	3	i.v.	3	0	0
	Ewingsarkom	1		1	0	0
	Chondrosarkom	1		1	0	0
	Osteitis deformans	1		1	0	0
	Osteomyelitis	3		3	0	0
	Non union von Tibia	1		1	0	0
	Non union von Radius	1		1	0	0
	Fraktur	1		1	0	0

Fortsetz. Tabelle II

Autoren Jahr	Diagnose	Fälle	Tetrac. Appl.	Fluoreszenz		
				+	-	?
Milch et al. 1961	Osteochondrome	4	p.o.	4	0	0
	Chondrosarkome	2	i.m.	1	1	0
	Knochen-Retikulosarkome	1		1	0	0
	Osteogenes Sarkom	1		1	0	0
	Knochen-Riesenzelltumor	1		1	0	0
	Carcinom-Knochenmetastasen	5		5	0	0
Klinge und Katz 1961	Carcinome	18	p.o.	17	1	0
	Kontrollen(nicht geschwulstartige Er- krankungen)	41		0	41	0
Berk und Kantor 1962	Magencarcinome	8	p.o.	8	0	0
	Malignes Lymphom	1		1	0	0
	Magenulcera:					
	mit Zellatypien	2		2	0	0
	ohne Zellatypien	4		0	4	0
	Magenadenom	1		0	1	0
	Magenleiomyom	1		0	1	0
	Hyperthroph.Gastritis	1		0	1	0
	Ulcus duodeni	1		0	1	0
	Normale Magen	7		0	7	0
	Perniziöse Anämien	2		0	2	0
	Polypöser Magentumor	1		0	1	0
	Magen-Ulcuscarcinom	1		1	0	0
Sandlow et al. 1963	Magencarcinome	21	p.o.	21	0	0
	Magenlymphosarkome	3		3	0	0
	Magenleiomyosarko	1		1	0	0
	Magenulcera	30		2	28	0
	Achylie	20		0	20	0

Fortsetz. Tabelle II

Autoren Jahr	Diagnose	Fälle	Tetrac. Appl.	Fluoreszenz		
				+	-	?
Sandlow et al. 1963	Kontrollen: Nicht geschwulstartige Erkrankungen des ober. Verdauungstraktes	25		0	25	0
Sherman et al. 1963	Magencarcinome	17	p.o.	16	1	0
	Gastritis	4	i.m.	0	4	0
	Magenulcera	18		1	17	0
	Magenpolypen	2		1	1	0
	Magenlymphome	2		0	2	0
	Magenmyome	2		0	2	0
	Kontrollen	64		0	64	0
Cabrera et al. 1964	Carcinome	11	p.o.	10	1	0
	Zystische Mastopathie	1		0	1	0
	Kontrollen	5		0	5	0
Cummins et al. 1964	Magencarcinome	24	p.o.	11	12	1
	Magenleiomyosarkom	1		0	1	0
	Magenulcera	50		2	48	0
	Perniziöse Anämien	14		3	11	0
	Pankreascarcinome	4		0	4	0
	Lungencarcinome	10		0	9	1
	Gutartige Erkrankungen des oberen Verdauungstr.	15		0	15	0
	Kontrollen	25		0	24	1
Donsky 1965	Verhorn.Plattenepithel- carcinome	14	p.o.	13	1	0
	Bowen'sche Erkrankung	2		1	1	0
	Chron. Hautulcera	7		1	6	0
	Besaliome	4		0	4	0

Fortsetz. Tabelle II

Autoren Jahr	Diagnose	Fälle	Tetrac. Appl.	Fluoreszenz		
				+	-	?
nsky 1965	Keratoakantom	1		0	1	0
	Hautcarcinom-Metastase	1		1	0	0
	Syringocyst. Adenom	1		0	1	0
	Ulcerierte Periarteriitis nodosa	1		0	1	0
	Ulcera nach Verbrennung	1		0	1	0
	Lymphatische Hyperplasie	1		0	1	0

TABELLE III

Tetracyclin-Fluoreszenz verschiedener Tumoren und nicht geschwulst-
artiger Erkrankungen bei Versuchstieren

Autoren Jahr	Diagnose	Fälle	Tetrac. Appl.	Fluoreszenz		
				+	-	?
Rall et al. 1957	Impftumoren:					
	Sarkom 37	72	i.p.	60	12	0
	Sarkom 180(Crocker)	1	s.c.	1	0	0
	Osteogenes Sarkom	3		3	0	0
	Yoshida Sarkom	1		1	0	0
	Krebs-2 Carcinom	1		1	0	0
	Barret Carcinom	1		1	0	0
	Ehrlich Carcinom	1		1	0	0
	Hepatom 129 P	1		1	0	0
	Hepatom 134	1		1	0	0
	Hepatom 7974	1		1	0	0
	Lymphom Nr.1	1		0	1	0
	Lymphom Nr.2	1		1	0	0
	Lymphom Nr.4	1		1	0	0
	Leukämie P-288	1		1	0	0
	Leukämie P-388	1		1	0	0
	Leukämie 2416	1		0	1	0
	Harding-Passey Melanom	1		0	1	0
	Cloudman Melanom S 91	1		0	1	0
Vassar et al. 1959	Hautulcera	15	p.o.	15	0	0
	Hautgranulome	5		5	0	0
	Abscesse	5		5	0	0
Yabe et al. 1964	Magencarcinome	31	p.o.	11	20	0
Tapp et al. 1965	Carcinome	18	i.m.	18	0	0
	Granulosa Tumoren	18	i.p.	0	18	0
	Mammacarcinome	24		24	0	0
	Leukämien	6		0	6	0

II.) Methodik:

1.) Tiermaterial:

Als Versuchstiere verwendeten wir Albino-Ratten des Wistar II-Stammes. Weibliche und männliche Tiere im Alter von 6 - 18 Monaten und mit einem Körpergewicht bis zu 500 g wurden in Makrolon^R - Käfigen bei einer Zimmertemperatur von $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ und einer Raumfeuchtigkeit von 50 - 60 % gehalten. Als Nahrung erhielten sie Altromin^R - Futter und Wasser ad libitum.

2.) Vorbehandlung der Tiere:

Für die verschiedenen Fragestellungen wurden die Tiere wie folgt vorbehandelt:

A) Akute Magenentzündungen

Männliche Ratten erhielten alle 24 Stunden eine Dosis von $d = 100 \text{ mg N-Nitroso-methyl-N-harnstoff (NMH)}/\text{kg}$ - Körpergewicht mit der Schlundsonde appliziert. Die Gesamtdosis betrug $D = 300 \text{ mg}/\text{kg}$. Diese weiße, grobkörnige Verbindung läßt sich in kleinen Wassermengen nur schwer lösen. Die Einzeldosis von $d = 100 \text{ mg}/\text{kg}$ mußte deshalb entsprechend der Magenkapazität des Versuchstieres in 2 - 5 ml Phosphat-Puffer-Lösung (pH 6.9 - 7.2) gelöst werden. Größere Konzentrationen lassen sich nur erreichen, wenn der NMH in Äthanol vorgelöst wird. Da bei einem pH 6-7 die Haltbarkeit der NMH-Lösung nur ein paar Stunden beträgt (DRUCKREY et al., 1967), wurde sie kurz vor der Applikation frisch angesetzt. Ein Zersetzen der Trockensubstanz kann

durch Konservierung in der Tiefkühltruhe bei -35°C weitgehend vermieden werden. Der Erhaltungszustand wurde durch Nachweis des Schmelzpunktes (108°C) kontrolliert.

B) Akute Lebernekrosen

Zur Erzeugung von ausgedehnten Lebernekrosen wurden weibliche und männliche Ratten mit Diäthylnitrosamin (DÄNA)⁺ p. o. behandelt. Sie erhielten täglich mit der Schlundsonde $d = 100\text{ mg/kg}$, das ist etwa die Hälfte der Dl_{50} . Die Gesamtdosis betrug 300 mg/kg . Das DÄNA, eine aromatische, gelbliche, leicht wasserlösliche Flüssigkeit, wurde kurzfristig vor der Applikation mit Aqua dest verdünnt.

C) Chronische Leberveränderungen

Diese wurden durch orale Zufuhr von DÄNA oder Thioacetamid hervorgerufen. Das DÄNA wurde täglich ($d = 15\text{ mg/kg}$) per os appliziert. Männliche und weibliche Ratten erhielten diese Verbindung 16 - 32 Tage lang und somit eine Gesamtdosis von $D = 240 - 540\text{ mg/kg}$. Außerdem wurden männliche Ratten 144 - 189 Tage mit Thioacetamid behandelt, das den Tieren im Trinkwasser in Form einer 0,035%igen Lösung zugeführt wurde.

D) Tumoren im oberen Verdauungstrakt

Eine Gruppe von Ratten, die wöchentlich 2mal $d = 20\text{ mg/kg}$ Dinitrosopiperidin durch subcutane Injektion erhalten hatte,

+(Die verschiedenen Nitrosamin- und Nitrosamid-Verbindungen wurden von den Herren Prof.Dr.H.DRUCKREY und Dipl.-Chem. Dr.R.PREUSSMANN freundlicherweise zur Verfügung gestellt.)

zeigte Ösophagustumoren. Die Gesamtdosis und die Induktionszeit betrugen $D = 1140 \text{ mg/kg}$ bzw. $d = 283 \text{ Tage}$. Eine weibliche Ratte, der 4mal $d = 40 \text{ mg/NMH/kg/täglich}$ appliziert wurde, entwickelte nach einer Induktionszeit von 153 Tagen ein Vormagencarcinom.

E) Lebercarcinome

Männliche und weibliche Ratten wurden gleichzeitig mit Thioacetamid (im Trinkwasser / $d = 0,035\%$ ige wässrige Lösung) und DÄNA ($d = 10 \text{ mg/kg/Tag}$) behandelt. Die Tiere erhielten das Thioacetamid 110 - 123 Tage und das DÄNA 79 Tage. Neben Leberveränderungen und -tumoren traten bei vereinzelt Tieren auch Papillome im Ösophagus auf.

Eine weitere Gruppe von 8 Ratten entwickelte Lebercarcinome nach Gaben von Äthyl-Äthanol-Nitrosamin (s. Tabelle 4). Ein Tier hatte außerdem ein Ösophaguspapillom.

F) Subcutane Sarkome

Diese Geschwülste traten nach lokaler Applikation von cancerogenen Kohlenwasserstoffen auf; es wurden das 1,2-Dimethyl-9,10-benzanthracen (DMBA) und das 3,4-Benzpyren (BP) verwendet. Den Tieren wurde einmalig 5 - 10 mg des Cancerogens subcutan bzw. intramuskulär appliziert. Nach einer Induktionszeit von 102 - 242 Tagen fanden sich am Ort der Applikation subcutane Tumoren.

3.) Tetracyclin-Fluoreszenz:

A) Pharmakologische und chemische Eigenschaften des Tetracyclins

Das Aureomycin war das erste aus dieser Reihe von Antibiotica, das aus den *Streptomyces aureofaciens*-Kulturen gewonnen wurde (DUGGAR, 1948). Zwei Jahre später fanden FINLAND und Mitarb. das Terramycin, das sie aus *Streptomyces rimosus*-Kulturen reinigten. Das erste halbsynthetisch hergestellte Antibioticum wurde Tetracyclin benannt, da inzwischen die chemische Konstitution dieser Medikamente bekannt war (EGER, 1962). Chemisch handelt es sich beim Aureomycin um ein Chlortetracyclin und beim Terramycin um ein Oxytetracyclin. Diese Antibiotica sind in reiner Substanz von hellgelber Farbe; sie lassen sich leicht in Wasser, Methanol, Aceton und anderen Flüssigkeiten lösen.

Besonders in alkalischer Lösung zeigt das Tetracyclin unter dem UV-Licht eine Fluoreszenz von goldgelber Farbe. Schon 1950 bestimmte SALTZMAN anhand dieser Fluoreszenz die Konzentration des Tetracyclins im Blut und im Urin. Tieruntersuchungen zeigten, daß kurz nach der Applikation das Antibioticum von allen Zellen und Organen aufgenommen wird; bei therapeutischen Dosen wird jedoch die Blutliquorschranke nicht durchbrochen.

Alle Antibiotica der Tetracyclin-Gruppe zeigen eine goldgelbe Fluoreszenz, die beim Dimethylchlor-Tetracyclin am stärksten in Erscheinung tritt. 24 Stunden nach Absetzen

des Antibioticums werden hohe Konzentrationen nur noch im Knochensystem und in den Zähnen nachgewiesen. Außerdem wird das Tetracyclin auch bei bestimmten Erkrankungen (s.Tab.1 u. 2) zurückgehalten. So fanden HELANDER und BOTTINGER (1953) auch in den Tumoren hohe Konzentrationen dieses Antibioticums, das allerdings nicht in den Tumorzellen, sondern in den nekrotischen Anteilen angereichert war (VASSAR et al., 1960), und zwar in den Mitochondrien der Makrophagen (DU BUY und SCHOWACRE, 1961). Durch biochemische und elektrophoretische Untersuchungen wurde festgestellt, daß das Tetracyclin in Anwesenheit von Calciumionen praezipitiert (LACKO et al., 1959). So lassen sich die höheren Konzentrationen im Bereich des Knochensystems und in den Verkalkungen im Tumorstroma erklären (MILCH, 1957, 1961).

B) Applikationsart

Das Tetracyclin wurde in Leitungswasser oder Aqua dest gelöst und anschließend per os, subcutan, intramuskulär oder intraperitoneal appliziert. Die Tiere erhielten 3 Einzeldosen von 200 mg/kg alle 12 Stunden und wurden 36 - 45 Stunden nach der letzten Applikation mit Äther getötet.

C) Nachweis der Tetracyclin-Fluoreszenz

Zwei in einem Schutzgehäuse mit einem Ventilator untergebrachte Quecksilberhochdruck-Lampen (Philips CS 150 W) dienten als Energie-Quelle. Das durch einen Hohlspiegel und einen Kollektor gebündelte Licht wurde mit einem 2 mm/UV-Filter gefiltert (Abb.1). Die untersuchten Organe

zeigten unter dem UV-Licht eine hellblaue bis hellgrüne Eigen-Fluoreszenz; das im Gewebe zurückgehaltene Tetracyclin wies dagegen eine hell- bis goldgelbe Fluoreszenz auf, die nach einigen Stunden abblasste. Bei -35° C konservierte Organe ließen dagegen noch nach Monaten eine deutliche Tetracyclin-Fluoreszenz erkennen.

Zur mikroskopischen Lokalisation der Tetracyclin-Fluoreszenz wurden 1,5 x 1,5 cm große Gewebstücke unter der makroskopischen UV-Licht-Kontrolle entnommen, im Kryostat geschnitten und anschließend unter dem Leitz-UV-Auflichtmikroskop (UV-Filter: UG1 und Sperrfilter 450 μ) untersucht. Auf diese Weise konnten die körnigen Tetracyclin-Ablagerungen lokalisiert werden; da aber die Fluoreszenz unter dem UV-Licht schnell abblasst, mußte auf eine fotografische Wiedergabe verzichtet werden.

Die zur Dokumentation angefertigten Makrofotografien wurden mit dem Tageslicht-Color-Film Agfa CT 18 aufgenommen. Dabei stellte sich heraus, daß sich die Schwarz-Weiß-Aufnahmen leichter durch Umkopieren der Farbdiaspositive herstellen lassen, als durch Direktaufnahme mit einem Kb-14-Film. Der Blaustich im Farbfilm ließ sich durch ein vor dem 2.8/135 mm Leitz-Objektiv angebrachten Rot-Konversions-Filter R 12 dämpfen.

Um die Tetracyclin-Fluoreszenz von der Primärfluoreszenz der Organe und der applizierten cancerogenen Kohlenwasserstoffe abzugrenzen, wurden zunächst diese Verbindungen im gelösten und ungelösten Zustand unter dem UV-Licht untersucht. Das Tetracyclin zeigte eine hell- bis dunkelgelbe

Fluoreszenz, während das DMBA hellblau und das BP goldgelb aufleuchtete (Abb.2). Auch durch die Einwirkung von Hitze oder Formalin ließ sich die labile, schnell abblassende Tetracyclin-Fluoreszenz von der Fluoreszenz der cancerogenen Kohlenwasserstoffe unterscheiden.

D) Histologische Untersuchung

Das durch Sektion der Versuchstiere gewonnene Material wurde in 5%igem Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und in üblicher Weise gefärbt. Außerdem wurde Frischmaterial in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -35°C aufgehoben.

III.) Eigene Befunde:

A) Akute, durch NMH hervorgerufene Magenveränderungen

Nach Applikation des NMH zeigten die Tiere die Symptome einer akuten Intoxikation. Der Allgemeinzustand verschlechterte sich, das Fell wurde grau und struppig, die Tiere nahmen kaum Nahrung zu sich. Der Kot war breiig und teerartig. Die Sektion deckte eine ödematös aufgelockerte Vormagenschleimhaut auf, von der sich kleinere Streifen des bedeckenden Plattenepithels abziehen ließen. Im stark verdickten Drüsenmagen fanden sich ausgedehnte Blutungen. Bei einem Tier lag außerdem eine umschriebene Erosion im Bereich der kleinen Magenkurvatur vor. Die Lungen zeigten unterschiedlich ausgeprägte Bronchiektasen, wie sie auch bei unbehandelten Ratten auftreten. Sonst lagen makroskopisch keine groben Veränderungen vor.

Unter dem UV-Licht ließen die Kontrolltiere - also die Tiere, die kein Tetracyclin erhalten hatten - keine Fremd- oder Sekundär-Fluoreszenz erkennen (R 805/66). Der Vormagen leuchtete hellblau, der Drüsenmagen hell- bis dunkelgrün auf. Bei den mit Tetracyclin vorbehandelten Ratten konnte im Bereich des Vormagens, und besonders in der Umgebung der Schleimhautfalte (Grenze zwischen Vor- und Drüsenmagen), eine stärkere goldgelbe Fluoreszenz beobachtet werden. Auch im Drüsenmagen traten punktförmige gelbliche Fluoreszenzherde auf; in den von Blutungen befallenen Wandanteilen waren sie dagegen nicht zu finden (Abb.3). Eine stärkere Tetracyclin-Fluoreszenz lag auch in den Bronchietaschen vor. Ein Tier, das kurz nach einer i.p. Tetracyclin-Applikation vorzeitig gestorben war, wies eine diffuse Fluoreszenz sämtlicher Bauchorgane, insbesondere des gesamten Magen-Darm-Traktes, auf.

Mikroskopisch zeigte der unter dem Fluoreszenz-Mikroskop untersuchte Kryostatschnitt gelb fluoreszierende Körnchen, besonders auf der Oberfläche des hier stärker hyperkeratistischen Plattenepithels des Vormagens. In den tieferen Wandschichten des Magens ließen sich keine Ablagerungen des Antibioticums nachweisen.

Bei dem spontan verstorbenen Tier fand sich auch im Stroma und in den Drüsen des Magens eine diffuse Tetracyclin-Fluoreszenz.

Der mit Haematoxylin-Eosin gefärbte Schnitt des Vormagens zeigte eine ausgeprägte ödematöse Auflockerung sämtlicher Wandschichten und eine unterschiedlich starke Hyperkeratose

des bedeckenden Plattenepithels. Im Drüsenmagen fanden sich umschriebene, z.T. ausgedehntere frischere Blutungen. Weiter bestätigte die mikroskopische Untersuchung die schon makroskopisch diagnostizierten Bronchiektasen.

B) Durch Diäthylnitrosamin hervorgerufene Lebernekrosen

Bei den mit hohen DÄNA-Dosen behandelten Tieren fanden sich nur in der Leber krankhafte Veränderungen. Die hellbraune Leberoberfläche zeigte kleinste rötliche Punkte, die Kapsel war gespannt und glatt. Die Konsistenz des Leberparenchyms erschien leicht vermindert.

Unter dem UV-Licht ließ die Leberschnittfläche nur eine hellgrüne Eigenfluoreszenz erkennen. Auch mikroskopisch war am untersuchten Kryostatschnitt keine spezifische Tetracyclin-Fluoreszenz nachzuweisen.

Die histologische Untersuchung deckte kleinere und größere, z.T. hämorrhagische Nekrosen auf, besonders in der Umgebung der Zentralvenen.

C) Chronische Leberveränderungen

a) Nach Gaben von Diäthylnitrosamin: Alle 5 Tiere zeigten eine feingranulierte Leberoberfläche von hellbrauner bis dunkelbrauner Farbe. Sowohl die Kontrolltiere als auch die mit Tetracyclin vorbehandelten Ratten ließen unter dem UV-Licht keine spezifische Fluoreszenz auf der Leberoberfläche und auf der Schnittfläche erkennen. Histologisch fand sich das Bild einer feinknotigen Leberzirrhose.

b) Nach Gaben von Thioacetamid: Die Leberoberfläche der

über längere Zeit mit Thioacetamid vorbehandelten Tiere war feingehöckert und von fester Beschaffenheit.

Das UV-Licht deckte eine dunkelgrün aufleuchtende, netzförmig gestaltete Eigenfluoreszenz auf (Abb.4); eine spezifische Tetracyclin-Fluoreszenz konnte weder makroskopisch noch mikroskopisch nachgewiesen werden. Die mit Haematoxylin-Eosin gefärbten Leberpräparate zeigten eine knotenförmige Gestaltung: sie wurden von feineren und gröberen bindegewebigen Septen durchzogen. In diesen Septen eingeschlossen fanden sich Entzündungszellen sowie reichlich gewucherte Pseudogallengänge, die stellenweise fast adenomartig gestaltet waren.

D) Tumoren im oberen Verdauungstrakt

Nach subcutaner Applikation von Dinitrosopiperidin entwickelten sich im Ösophagus Papillome. An den übrigen Organen ließen sich keine wesentlichen pathologischen Veränderungen nachweisen.

Makroskopisch zeigten die Papillome unter dem UV-Licht eine Tetracyclin-Fluoreszenz, besonders im Bereich der Papillomspitzen (Abb.5). Nur bei einem Tier mit einer ausgedehnten Blutung war diese Reaktion negativ. Mikroskopisch war die spezifische Fluoreszenz in den oberflächlichen Hornlamellen der Papillome lokalisiert. Auch das hyperkeratotische Ösophagusepithel ließ eine leichte positive Tetracyclin-Fluoreszenz erkennen.

Histologisch handelt es sich um an der Oberfläche stärker verhornende Papillome, die ein ruhiges Zellbild zeigten.

Auch zur Tiefe hin fand sich kein infiltrierendes Wachstum als Zeichen einer malignen Entartung. Die geschwulstfreie Ösophagusschleimhaut wies stellenweise eine stärkere Verhornung auf.

Nach oraler Gabe von Nitrosomethylharnstoff entwickelte sich bei einer Ratte ein Plattenepithelcarcinom im Vormagen. Makroskopisch fand sich eine ausgeprägte hyperkeratotische Verdickung der gesamten Vormagenschleimhaut, die im Zentrum eine umschriebene Wucherung mit kraterförmiger Einziehung zeigte (Abb.6). Weder makroskopisch noch mikroskopisch konnte bei diesem Tumor eine spezifische Tetracyclin-Fluoreszenz beobachtet werden. Die histologische Untersuchung ergab ein infiltrierend wachsendes Plattenepithelcarcinom, das sämtliche Wandschichten des Vormagens durchsetzte.

E) Durch gleichzeitige Gaben von DÄNA und Thioacetamid und durch Äthyl-Äthanolnitrosamin erzeugte Lebertumoren

Schon vor dem Tode wiesen diese Tiere eine ausgeprägte ikterische Verfärbung der Ohren, Extremitäten und Augen auf. Die Sektion ergab eine stark vergrößerte Leber mit einer teils grobknotigen, teils feinknotigen Oberfläche. Auf der Schnittfläche fanden sich kleinere und größere, stellenweise hämorrhagisch nekrotische Knoten. Bei allen Tieren konnten Lungenmetastasen sowie Bronchiektasen nachgewiesen werden. Eine Ratte zeigte als Nebenfund - als Folge der DÄNA Einwirkung - mehrere verhornende Ösophaguspapillome. Die geschwulstfreien Leberanteile der Tiere, die kein Tetracyclin erhalten hatten, zeigten unter der UV-Lampe eine

hellgrüne Eigenfluoreszenz, während die Tumoren mit einer hellblauen Farbe aufleuchteten (Abb.7).

Bei den mit Tetracyclin vorbehandelten Ratten konnte nur in den weitgehend nekrotischen Anteilen der Lebertumoren eine deutliche Tetracyclin-Fluoreszenz beobachtet werden (Abb.8). Die Lungenmetastasen waren mit einer Ausnahme negativ. Bei einem Tier mit ausgeprägten Bronchiektasen waren diese sowie die hämatogenen Geschwulstabsiedlungen stark Tetracyclin-Fluoreszenz-positiv (Abb.9). Im Kryostat-schnitt ließ sich hier Tetracyclin in den Makrophagen und in den nekrotischen Tumorzellen nachweisen.

Histologisch ergab die Untersuchung der Leberstücke eine feinseptale Zirrhose mit stärkerer Pseudogallengangswucherung. Bei den makroskopisch nachgewiesenen Knoten handelte es sich um Regeneratknoten und um vorwiegend trabekulär gestaltete Lebercarcinome, die z.T. hämorrhagisch nekrotisch waren.

Bei einem Tier fand sich - wie bereits erwähnt - als Nebenfund ein gestieltes Papillom im Ösophagus, das in früheren Versuchen bei hohen DÄNA-Dosierungen nur gelegentlich, bei niedrigeren Dosen dagegen häufiger beobachtet wurde (THOMAS, 1961). Auch hier zeigte sich im Bereich der oberflächlichen Hyperkeratose des Papilloms eine positive Tetracyclin-Fluoreszenz.

Nach Gaben von Äthyl-Äthanol-Nitrosamin traten Lebertumoren und ein Ösophaguspapillom auf, die in ihrem makroskopischen und mikroskopischen Bild den oben beschriebenen DÄNA/Thioacetamid-Tumoren entsprachen.

F) Subcutane Sarkome nach subcutaner Applikation von
DMBA und von BP

Am Ort der Applikation fanden sich taubeneigroße Tumoren von z.T. fester, z.T. weicher Beschaffenheit. Einzelne Geschwülste waren bereits oberflächlich ulceriert. Auf der Schnittfläche zeigten sie in den erhaltenen Partien eine fischfleischähnliche Beschaffenheit; daneben fanden sich auch ausgedehnte Nekrosen und Blutungen.

Unter dem UV-Licht wiesen die erhaltenen Geschwulstanteile eine hellgrüne Eigenfluoreszenz auf; die Nekrosen und Blutungen leuchteten dagegen dunkelblau auf. Bei einem Tier konnte außerdem eine ausgeprägte Rotfluoreszenz beobachtet werden (Abb.10). Bei den mit Tetracyclin vorbehandelten Tieren fand sich im Randbereich der Geschwülste eine intensive goldgelbe Fluoreszenz. Diese Tetracyclin-Fluoreszenz ließ auch die paraaortalen Lymphknotenmetastasen und die Geschwulstablagerungen in beiden Lungenflügeln erkennen (Abb.11).

Einem Tier wurde das Cancerogen unter die Rückenhaut appliziert; der sich hier entwickelnde Tumor griff auf die Wirbelsäule über und ummauerte das Rückenmark. Die Geschwulst, die weitgehend frei von Nekrosen war, zeigte keine Tetracyclin-Fluoreszenz, dagegen waren die Ablagerungen des Antibioticums im Knochen der angeschnittenen Rippen deutlich zu erkennen.

Die mikroskopische Untersuchung der Kryostatschnitte der gezielt unter dem UV-Licht entnommenen Gewebeproben zeigte, daß die Tetracyclin-Fluoreszenz in den nekrotischen Rand-

TABELLE IV

Tetracyclin-Fluoreszenz von Nekrosen, Entzündungen und Tumoren bei Ratten. Eigene Untersuchungen

Ratte Nr.	Verbindung	d	D	t	Tetrac. Appl.	Organveränderungen und Tumoren	Fluoreszenz
Akute Entzündungen und Nekrosen in Magen und Leber							
782/66	NMH	100	300	3	♂	Magenblutungen u.-Ödem	- -
795/66	NMH	100	300	3	p.o.	Magenblutungen u.-Ödem Vornasen-Hyperkeratose	+ +
796/66	NMH	100	300	3	p.o.	Magenblutungen u.-Ödem	+ +
805/66	NMH	100	300	3	p.o.	Magenblutungen, Ödem u.-Erosion	+ +
806/66	NMH	100	300	3	p.o.	Magenblutungen u.-Ödem	+ +
980/66	NMH	100	300	3	i.p.	Autolyse (spontan gestorben)	diffuse T.-Fluoreszenz der Bauchorgane
981/66	NMH	100	300	3	i.p.	Autolyse (spontan gestorben)	- -
984/66	NMH	100	300	3	i.p.	Magenblutungen, Ödem u.-Nekrosen Bronchiektasen der Lunge	+ + + +
985/66	NMH	100	300	3	i.p.	Autolyse (spontan gestorben)	- -
986/66	NMH	100	300	3	i.p.	Magenblutungen u.-Ödem	+ +
807/66	DANA	100	300	3	♂	Leber: Blutstauung und umschriebene Parenchynekrosen	- -
813/66	DANA	100	300	3	p.o.	Leber: hämorrhagische Nekrosen	- -
815/66	DANA	100	300	3	p.o.	Leber: Blutstauung und umschriebene Parenchynekrosen	- -
816/66	DANA	100	300	3	p.o.	Leber: hämorrhagische Nekrosen	- -
Chronische Entzündungen und Fibrosen in der Leber							
821/66	DANA	15	240	16	♂	Leber: Pseudogallengangswucherungen u. kleinere Regeneratknoten	- -
830/66	DANA	15	285	19	♂	Leber: Pseudogallengangswucherungen u. Regeneratknoten	- -
838/66	DANA	15	375	25	♂	Autolyse (spontan gestorben)	- -
873/66	DANA	15	480	32	♂	Leber: Feinseptale Cirrhose	- -
882/66	DANA	15	540	36	p.o.	Leber: Feinseptale Cirrhose	- -
783/66	THIOAC. 0,035*	819	144		p.o.	Lebercirrhose	- -
791/66	THIOAC. 0,035*	819	144		♂	Lebercirrhose	- -
871/66	THIOAC. 0,035*	1188	189		♂	Lebercirrhose	- -

Erläuterungen zur Tabelle: DANA Diäthylnitrosamin, NMH N-Nitroso-N-methylharnstoff, THIOAC. Thioacetar DNP Dinitrosopiperidin, DMBA 1,2-Dimethyl 9,10-Benzanthracen, BF 3,4-Benzpyren, AA-NO Äthyl-Athenol-Nitrosamin, d = Einzeldosis in mg/kg-Körpergewicht, D = Gesamtdosis in mg/kg-Körpergewicht, DMBA u. BF werden in mg/Tier angegeben, t = Induktionszeit der Tumoren bzw. Applikationsdauer in Tagen, Appl.: Applikationsart: p. o. per os, i. m. intramuskulär, s.c. subcutan, i. p. intraperitoneal. * Das Thioacetar wurde täglich ad libitum in Form einer 0,035%igen Trinkwasserlösung verabreicht.

Fortsets. Tabelle IV

Ratte Nr.	Verbindung d	D	t	Tetrac. Appl.	Organveränderungen und Tumoren	Fluoreszenz
Gut- und Bösartige Tumoren in ober. Verdauungstrakt						
626/66	DWP	20	1140	283	p.o. Oesophaguspapillome	++
627/66	DNP	20	1140	283	p.o. Oesophaguspapillome	++
1036/66	NMH	40	160	153	s.c. Verhornendes Plattenepithel Carcinom des Vormagens	--
in Subcutis						
839/66	DMBA	5	5	102	§ Fibrosarkom	--
1006/66	DMBA	5	5	152	p.o. Myosarkom mit Nekrosen	++
1007/66	DMBA	5	5	152	p.o. Myosarkom mit Nekrosen	++
836/66	BP	10	10	143	§ Fibrosarkom	--
880/66	BP	10	10	151	§ Fibrosarkom mit Nekrosen	--
881/66	BP	10	10	175	p.o. Rhabdomyosarkom mit retro- peritonealen-Lymphknoten- und Lungenmetastasen	++ ++ ++
904/66	BP	10	10	157	p.o. Fibrosarkom mit Lungenmetastasen	++ --
27/67	BP	10	10	242	p.o. Fibrosarkom mit Nekrosen	++
951/66	BP	5	5	146	p.o. Fibrosarkom mit Nekrosen	++
982/66	BP	5	5	148	p.o. Fibrosarkom mit Nekrosen	++
in Leber						
3816/65	KA-NO	20	7200	365	p.o. Lebercarcinom	++
3817/65	KA-NO	20	7200	365	p.o. Lebercarcinom	--
3818/65	KA-NO	20	7200	365	p.o. Lebercarcinom	++
3819/65	KA-NO	20	7200	366	p.o. Lebercarcinom	++
3820/65	KA-NO	20	7200	366	§ Lebercarcinom	--
3821/65	KA-NO	20	7200	368	p.o. Lebercarcinom	--
3824/65	KA-NO	20	7500	370	p.o. Lebercarcinom und Oesophaguspapillom	++ ++
3825/65	KA-NO	20	7200	370	p.o. Lebercarcinom mit Lungenmetastasen	++ ++
3828/65	§ Kontrolle			§	Normale Organe	--
3829/65	§ Kontrolle			p.o.	Normale Organe	--
870/66	DANA 10 THIOAC. 0,035°	1100 426	110 79	§	Lebercirrhose, Blutung., Nekrosen, Carcinom mit Lungenmetastasen	-- -- --
876/66	DANA 10 THIOAC. 0,035°	1130 269	113 79	p.o.	Leber: Cirrhose, Carcinom mit Nekrosen, Lungenmetastase	-- --
877/66	DANA 10 THIOAC. 0,035°	1130 423,5	113 79	p.o.	Leber: Cirrhose, Carcinom mit Nekrosen, Lungenmetastase, Bronchiektasen Oesophaguspapillom	++ ++ ++
878/66	DANA 10 THIOAC. 0,035°	1130 447	113 79	p.o.	Leber: Cirrhose, Carcinom mit Nekrosen, Lungenmetastase Oesophaguspapillome	++ -- ++
913/66	DANA 10 THIOAC. 0,035°	1230 473,5	123 79	i.m.	Leber: Cirrhose, Carcinom mit Nekrosen Lungenmetastase	++ --

partien der Geschwulst sich lokalisierte. Hier fanden sich reichlich nekrotische Tumorzellen sowie Makrophagen (Abb. 12). Im Bereich der Blutungen und der abszeßartigen Ansammlungen von Leukozyten trat dagegen keine spezifische Fluoreszenz auf.

Histologisch handelte es sich bei den nachgewiesenen Tumoren um teils polymorphzellige, teils spindelzellige Sarkome. Mitosen und Zellatypien waren reichlich vorhanden. Zwischen den Geschwulstzellen entwickelte sich ein dichtes Gitterfasernetz, eine stärkere Kollagenfaserneubildung wurde nur in vereinzelten Fällen beobachtet. Diese weitgehend entdifferenzierten Tumoren entsprachen in ihrem Aufbau dem histologischen Bild eines Fibrosarkoms bzw. eines Rhabdomyosarkoms, obwohl eine Querstreifung im Cytoplasma der Geschwulstzellen nicht nachgewiesen werden konnte. Diese subcutanen Sarkome wiesen ein stark infiltrierendes Wachstum auf und setzten Metastasen in die benachbarten Lymphknoten sowie in die Lungen.

Die restlichen Organe zeigten weder makroskopisch noch histologisch erwähnenswerte Veränderungen.

IV.) Diskussion

Die Tetracyclin-Fluoreszenz läßt sich an Hand der Farbe und der Organlokalisation gut von den körpereigenen, fluoreszierenden Verbindungen abgrenzen, die eine Primärfluoreszenz von ähnlicher Farbe hervorrufen könnten (s. Tabelle 5).

Tabelle 5

Stoff	Fluoreszenz
Ceroid	gelb
Lipofuscin	gelb bis braun
Vitamin A	leuchtend blau-grün
Riboflavin	gelb bis grün

Von den körperfremden Verbindungen, die gelegentlich auch eine goldgelbe Fluoreszenz hervorrufen und somit mit einer Tetracyclin-Fluoreszenz zu verwechseln wären, ist besonders das 3,4 Benzpyren zu erwähnen. Hierbei handelt es sich jedoch um einen stabilen Stoff bzw. um eine Fluoreszenz, die auch nach Einwirkung von Hitze und Formalin bestehen bleibt, während die Tetracyclin-Fluoreszenz schon bei Zimmertemperatur nach ein paar Stunden abblasst.

Die Tetracyclin-Fluoreszenz ist erst von diagnostischem Wert, wenn die Untersuchung frühestens 30 Stunden nach der letzten Applikation des Antibioticums durchgeführt wird. Zu diesem Zeitpunkt ist es nämlich bereits wieder ausgeschieden und wird nur in Knochen, Zähnen sowie in pathologisch veränderten Organen zurückgehalten. Dabei spielt die Applikationsart des Antibioticums keine Rolle.

Beim Vergleich unserer im Tierversuch gewonnenen Ergebnisse mit den in der Literatur niedergelegten Beobachtungen am Menschen ergeben sich Übereinstimmungen, aber auch Unterschiede. Im folgenden sollen diese Befunde gegenüber-

gestellt werden.

1.) Magen:

Zur Zeit gelingt es kaum, regelmäßig und in hoher Ausbeute experimentelle Drüsenmagentumoren bei der Ratte - die man als Vergleich der menschlichen Geschwülste verwenden könnte - zu erzeugen (BUTLER und BARNES, 1966). Daher beschränkten wir unsere Untersuchungen an diesem Organ auf die akute Entzündung, deren histologisches Bild uns nach hochdosierter oraler Gabe von Nitrosomethylurethan gut bekannt ist (SCHMÄHL und THOMAS, 1962). Im akut entzündeten Magen der Ratte konnten wir lediglich in der Umgebung der Schleimhautfalte des von Plattenepithel ausgekleideten Vormagens eine stärkere positive Tetracyclin-Fluoreszenz beobachten. Hier aber lag das Antibioticum nicht in der Magenwand, sondern auf der Oberfläche der zum Teil gelösten Hornlamellen der Schleimhaut. Nur bei vereinzelt Tieren war auch im Drüsenmagen eine leichtere Tetracyclin-Fluoreszenz zu finden. Hier stimmen die experimentellen Ergebnisse mit den Beobachtungen aus der Humanpathologie überein: auch bei den Menschen war bei histologisch gesicherten, gutartigen Magenulcera die Tetracyclin-Fluoreszenz gelegentlich positiv (s. Tabelle 2). Das Antibioticum wurde vorwiegend in den in Nekrosen vorkommenden Makrophagen und Calciumsalzen gespeichert und zurückgehalten (HELANGER und BOTTINGER, 1953; DU BUY und SCHOWACRE, 1961). Weiter sind die Mitteilungen von SANDLOW und Mitarbeitern (1963), SHERMAN und CHRYSSANTHOU (1963), sowie HÄKKINNEN und HARTIALA (1959) zu erwähnen, die bei Fällen von akuter

und chronischer Gastritis ebenfalls eine Tetracyclin-Fluoreszenz fanden, welche nicht durch eine Geschwulst hervorgerufen wurde und somit als falsch positive Reaktion zu deuten war.

2.) Leber:

Bei den akuten und chronischen Leberveränderungen war die Tetracyclin-Fluoreszenz in unseren Experimenten stets negativ. Sowohl bei den akuten Lebernekrosen und -blutungen als auch bei den Leberfibrosen und -zirrhosen war keine spezifische Reaktion zu beobachten. TAPP und CARROLL (1965 a,b,c und 1966), die ebenfalls eine Leberfibrose bei Ratten durch Gaben von Tetrachlorkohlenstoff oder Thioacetamid erzeugten, fanden allerdings in den Lebernekrosen eine Tetracyclin-Fluoreszenz, die sie auf Anwesenheit von Calciumsalzen zurückführten. Auch beim Menschen wurde untersucht, ob das Antibioticum bei Leberzirrhosen zurückgehalten wird. SANDLOW und Mitarbeiter (1966) fanden im Ascites von 2 Patienten mit Leberzirrhose keine spezifische Fluoreszenz. Auch CUMMINS und Mitarbeiter (1964) kontrollierten Ascites-Sediment bei 5 leberkranken Patienten (4 Leberzirrhosen und 1 Metastasen-Leber) und stellten nur bei einer postnekrotischen Zirrhose eine positive Reaktion fest.

3.) Tumören:

Bei den experimentell erzeugten Tumoren waren die Ergebnisse unterschiedlich. Bei den Lebercarcinomen konnte eine positive Fluoreszenz nur in den Randpartien der stärker

nekrotischen Lebercarcinome beobachtet werden. Die Lungenmetastasen waren mit einer Ausnahme negativ. In der Literatur konnten wir keine entsprechenden Untersuchungen bzw. Angaben finden.

Die Tetracyclin-Fluoreszenz der Plattenepithelcarcinome untersuchten wir am Beispiel der induzierten Tumoren im Bereich des oberen Verdauungstraktes, der bei der Ratte von einem mäßiggradig verhornenden Plattenepithel ausgekleidet wird. Es zeigte sich, daß in den meisten Fällen - unabhängig von der Dignität der Geschwulst (also bei Papillomen und Carcinomen) - eine positive Tetracyclin-Fluoreszenz vorlag. Bemerkenswert war die besonders starke Fluoreszenz im Bereich der Spitze der Papillome. Ein infiltrierend wachsendes, nur mäßiggradig verhornendes Plattenepithelcarcinom des Vormagens zeigte dagegen keine spezifische Fluoreszenz. Eine Erklärung für dieses Ergebnis bot uns folgende Beobachtung: nach Hantieren mit der Tetracyclin-Lösung zeigte die eigene Haut unter dem UV-Licht - auch nach gründlichem Bürsten mit Wasser und Seife - eine deutliche goldgelbe Fluoreszenz. Tetracyclin besitzt offenbar eine Affinität zu Keratin und wird von diesem gebunden, wenn beide Stoffe in unmittelbaren Kontakt gelangen; daher auch die spezifische Fluoreszenz der stärker verhornenden Ösophaguspapillome.

Aus der Humanpathologie sind uns Fälle bekannt, bei denen verhornende Plattenepithelcarcinome der Haut eine stärkere positive Tetracyclin-Fluoreszenz aufwiesen. So fand DONSKY (1965) bei 13 von 14 Patienten mit einem Kankroid eine

positive Fluoreszenz, während sie bei Basaliomen stets negativ ausfiel. In diesen Fällen wurde das Antibioticum p.o. zugeführt. Ähnlich wie bei dem von uns beobachteten nur mäßiggradig verhornenden Plattenepithelcarcinom des Vormagens der Ratte dürfte das Fehlen einer Verhornung der Basaliome Ursache des negativen Ausfalles sein.

Bei den experimentell erzeugten subcutanen Sarkomen fanden wir nur im Bereich der Randpartien und der stärker nekrotischen Tumoranteile eine positive Tetracyclin-Fluoreszenz (s. Tabelle 4). Dieses Ergebnis stimmt mit Beobachtungen menschlicher Neubildungen überein. Auch hier dürfte die positive Tetracyclin-Fluoreszenz auf das bereits erwähnte Vorhandensein von Makrophagen und Calciumsalzen in den Nekrosen zurückzuführen sein.

V.) Schlußfolgerungen und Zusammenfassung:

In den letzten Jahren sind mehrere Arbeiten veröffentlicht worden, die sich mit der Tetracyclin-Fluoreszenz geschwulstartiger und tumorverdächtiger Organveränderungen beim Menschen beschäftigen. Einige Autoren behaupteten, daß der Nachweis einer Tetracyclin-Fluoreszenz bei bestimmten Organveränderungen auf das Vorliegen einer bösartigen Geschwulst hinweist. Diese besonders am Magen durchgeführten Untersuchungen wurden als KLINGER-KATZ-TEST bekannt, dabei waren die von verschiedenen Autoren erzielten Ergebnisse sehr unterschiedlich.

Um die Frage zu beantworten, ob dieser Test eine genügende Treffsicherheit für die Krebsdiagnostik aufweist, wurden

mehrere Tierversuche durchgeführt und anschließend die Ergebnisse den aus der Humanpathologie bekannten Beobachtungen gegenübergestellt. In diesen Versuchen wurde die Tetracyclin-Fluoreszenz am Beispiel der akuten und chronischen Entzündungen sowie an Tumoren geprüft. Die experimentellen Untersuchungen bestätigten die am Menschen bereits erhobenen Befunde; sie zeigten, daß die Tetracyclin-Fluoreszenz nicht auf die Aufnahme des Antibioticums durch eine Tumorzelle zurückzuführen ist, sondern daß diese vorwiegend von Makrophagen und Calciumsalzen gebunden werden, die in Nekrosen vorkommen. Weiter stellte sich heraus, daß das Tetracyclin, wenn es unmittelbar mit Keratin in Kontakt kommt, auch von diesem zurückgehalten werden kann.

Die bei bestimmten Organveränderungen vorkommende Tetracyclin-Fluoreszenz ist daher nicht als spezifisches oder gar pathognomonisches Zeichen einer bösartigen Geschwulst anzusehen. Die Reaktion weist u.a. auf Nekrosen bzw. Entzündungen hin, die allerdings in der Umgebung einer bösartigen Geschwulst häufiger zu finden sind als bei gutartigen Neoplasien. Gelegentlich kann auch eine stärkere Verhornung - wie sie bei gutartigen und bösartigen Tumoren auftritt - Ursache einer Tetracyclin-Fluoreszenz sein.

r

VI.) Abbildungen.

Abb.1 : Zwei Quecksilberhochdruck-Lampen (Philips CS 150) mit Schutzgehäuse als Energie-Quelle für die Makro-Fluoreszenz.

Abb.2 : Fluoreszenz von 3,4 Benzpyren, Tetracyclin und 1,2-Dimethyl 9,10-Benzanthracen. Oben in gelöst, unten in ungelöst Form.

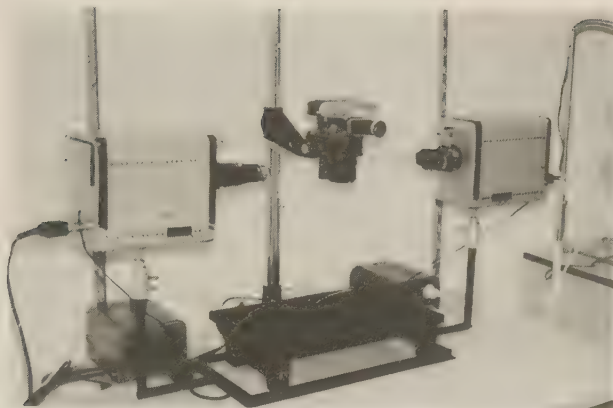


Abb. 1

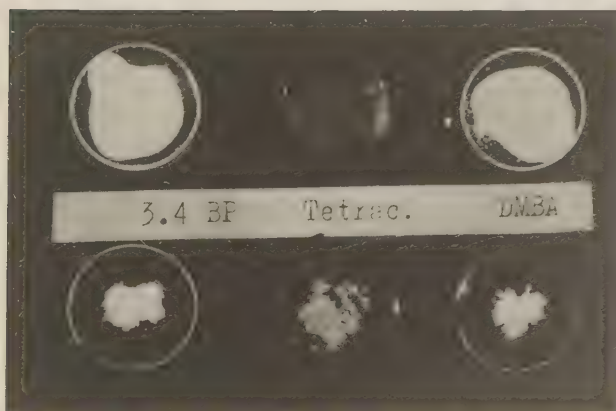


Abb. 2

Abb.3 a und b : Nach Tetracyclinbehandlung zeigt der Vormagen, besonders im Bereich der Schleimhautfalte, eine starke goldgelbe Fluoreszenz. Spärliche Fluoreszenz in dem von Blutungen befallenen Drüsenmagen (Abb.4b). Abb.4a bei Tageslicht.



Abb. 3 a

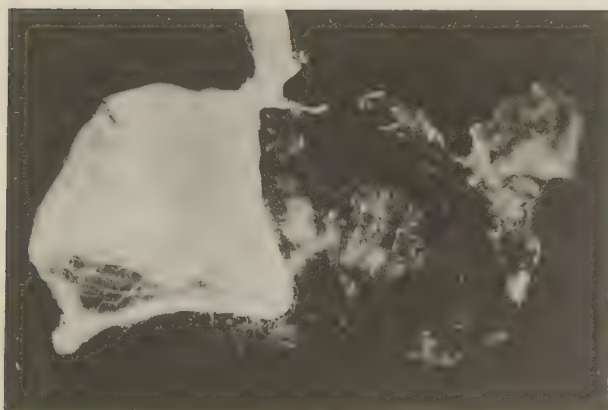


Abb. 3 b

Abb.4 a und b: Feingehöckerte Leberoberfläche nach oraler Gabe von Thioacetamid (4a).
Unter dem UV-Licht (4b) ist die Eigenfluoreszenz als Netzzeichnung erkennbar. Keine spezifische Tetracyclinfluoreszenz.

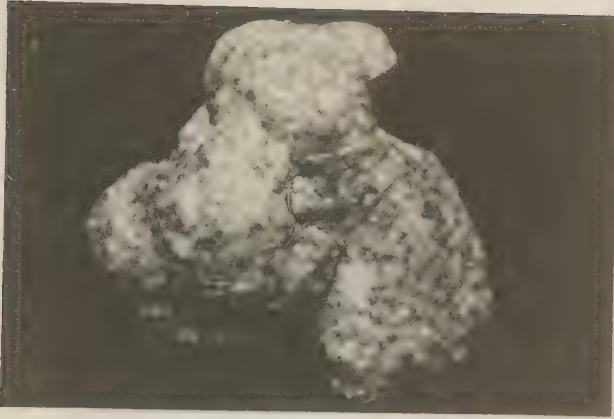


Abb. 4 a

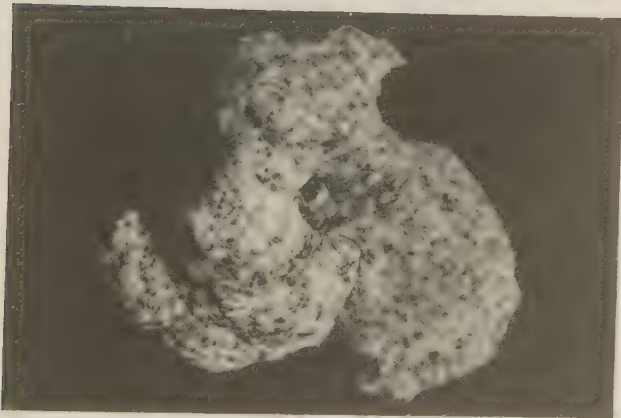


Abb. 4 b

Abb.5 : Oesophaguspapillom nach oraler Applikation von DÄNA: Links Tetracyclinfluoreszenz unter UV-Licht. Rechts Makrophotographie mit Tageslicht.

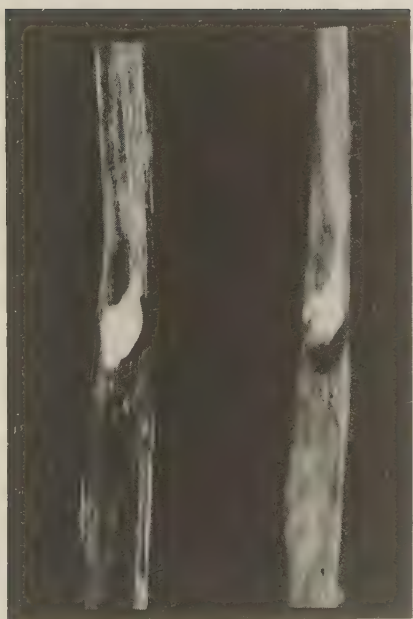


Abb. 5

Abb.6 a und b : Hyperkeratose des Vormagens mit kraterförmigem Plattenepithelcarcinom. Abb. 6a bei Tageslicht, Abb. 6b unter UV-Licht: Keine spezifische Tetracyclinfluoreszenz.



Abb. 6 a



Abb. 6 b

Abb.7 : Oben: Unter dem UV-Licht zeigt der Tumor eine blaue Eigenfluoreszenz, das geschwulstfreie Lebergewebe leuchtet blau-grün auf. Keine Tetracyclinvorbehandlung.

Unten: Solides Lebercarcinom nach oraler Gabe von DÄNA.

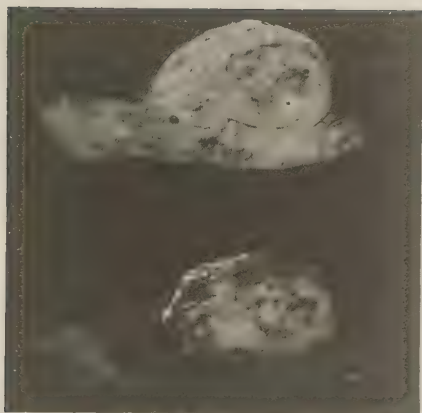


Abb. 7

Abb.8 a und b : (a) Stellenweise nekrotisches Lebercarcinom nach oraler Gabe von DÄNA.

Unten (b): Unter dem UV-Licht zeigen die nekrotischen Geschwulstanteile nach der Tetracyclin-Vorbehandlung eine positive, goldgelbe Fluoreszenz. Das tumorfreie, zirrhotisch umgebaute Parenchym leuchtet grünlich auf.

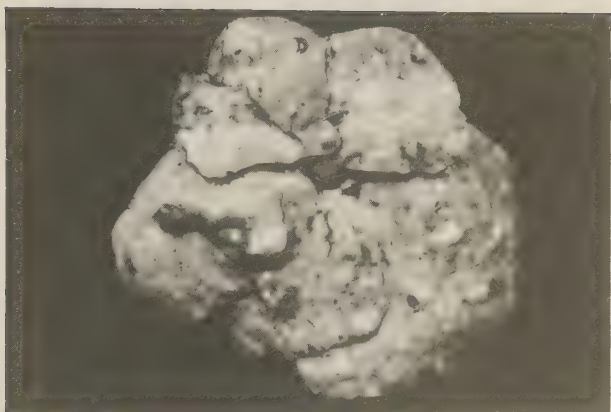


Abb. 8 a

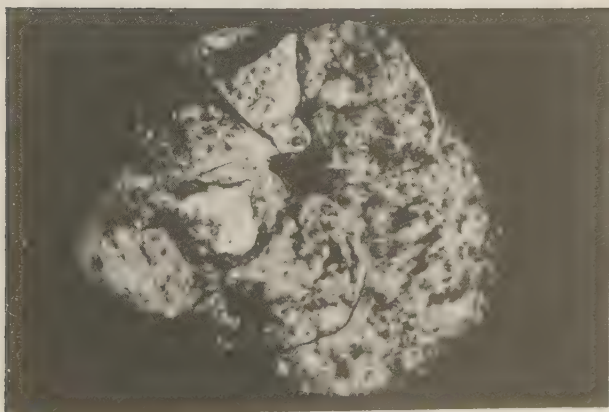


Abb. 8 b

Abb.9 a und b : a) Knotige Lungenmetastasen eines mit
DÄNA induzierten Lebercarcinoms. b) Unter dem
UV-Licht ausgeprägte positive Tetracyclin-
Fluoreszenz der zum Teil nekrotischen Meta-
stasen.



Abb. 9 a

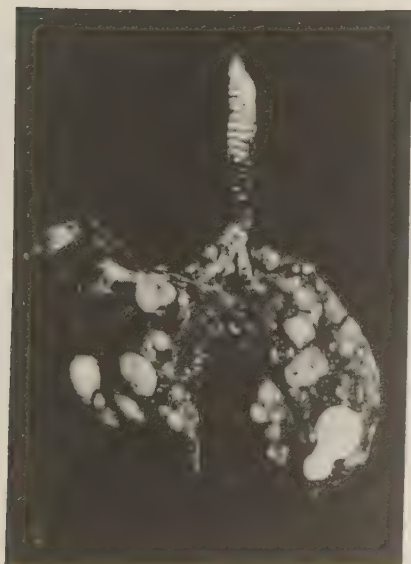


Abb. 9 b

Abb.10 a und b : a) Subcutanes Sarkom nach lokaler Applikation von 3,4 BP. In den nekrotischen Randgebieten der Geschwulst eine rötliche Eigenfluoreszenz (Protoporphyrin) und ein goldgelber Tetracyclinfluoreszenzsaum (b unter UV-Licht).

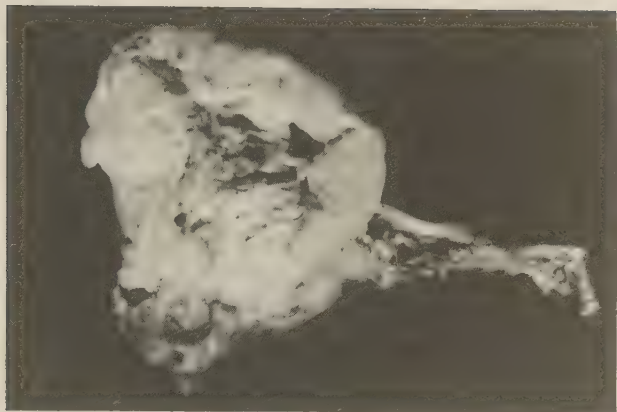


Abb. 10 a

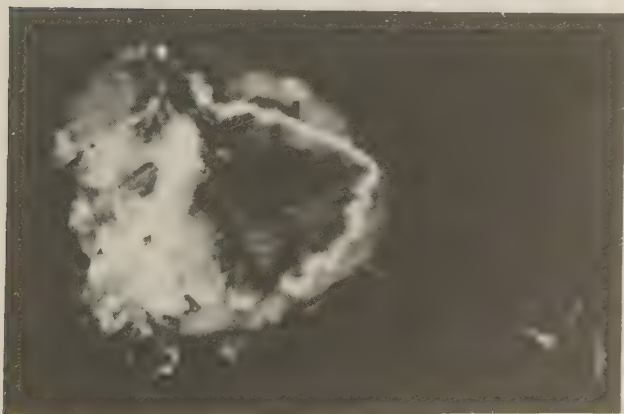


Abb. 10 b

Abb. 11 a und b : a) Subcutanes Sarkom an der Hinterpfote nach lokaler Applikation von 3,4 EP. Paraaortale Lymphknoten- und Lungenmetastasen. b) Dasselbe unter UV-Licht: positive Tetracyclinfluoreszenz im Primärtumor und in den Geschwulstabsiedlungen.



Fig. 11 a

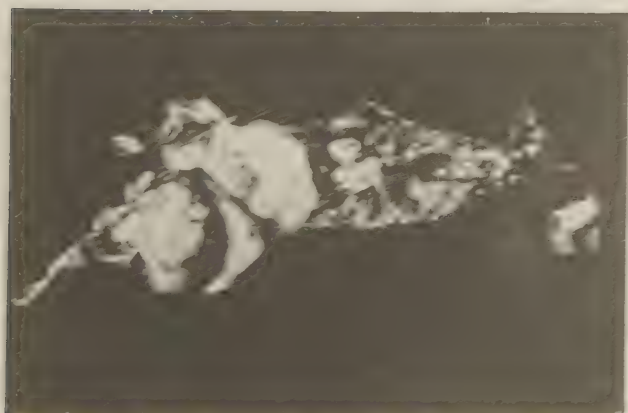


Fig. 11 b

Abb.12 a und b : a) Im Übersichtsbild erkennt man rechts Anteile der noch erhaltenen Geschwulst und links die ausgedehnten Nekrosen mit Kalkablagerungen (Haematoxylin-Eosin, 30mal). b) Stärkere Vergrößerung des Tumors und der angrenzenden Nekrose. Die Geschwulst besteht aus teils polymorphen, teils spindeligen Zellen mit Kernatypien. (Haematoxylin-Eosin, 120mal).

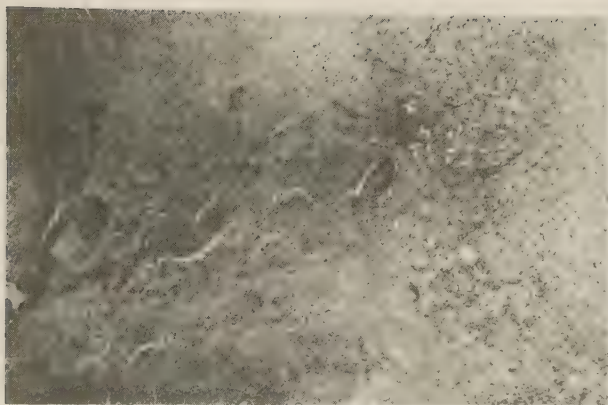


Abb. 12 a

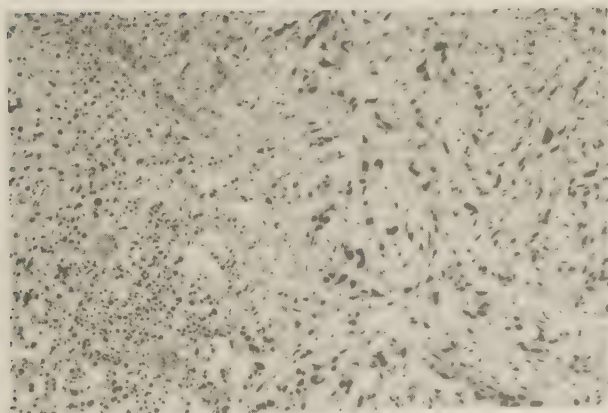


Abb. 12 b

VII.) Literaturverzeichnis

- | | |
|--|--|
| Ackerman, N.B., and
A.S. McFee: | Tetracycline fluorescence in
benign and malignant tissues.
Surgery <u>53</u> : 247 (1963). |
| Berk, J.E., and
S.M.Kantor: | Demethylchlortetracycline-in-
duced fluorescence of gastric
sediment- use to differentiate
benign and malignant gastric
lesions.
J.Amer.Med.Ass. <u>179</u> : 997 (1962). |
| Bertalanffy, L. v.: | Acridine orange fluorescence in
cell physiology, cytochemistry
and medicine.
Protoplasma <u>57</u> : 51 (1963). |
| Bertalanffy, L. v., and
F.D. Bertalanffy: | Die Fluoreszenzmethode in der
exfoliativen Cytologie, beson-
ders der Diagnose des Lungen-
krebses.
Naturwiss. <u>7</u> : 165 (1960). |
| Bottinger, L.E.: | On the distribution of tetra-
cycline in the body.
Antibiot.Chemother.(NY) <u>5</u> : 332
(1955). |
| Butler, W.H., and
J.M. Barnes: | Carcinoma of the glandular
stomach in rats given diets
containing Aflatoxin.
Nature (Lond.) <u>209</u> : 90 (1966). |

- Cabrera, A., Jurado, J., S. de la Pava and J.W. Pickren: Tetracycline fluorescence of some human tumors. N.Y.State J.Med. 64: 981 (1964).
- Cummins, A.J., Gompertz, M.L., and J.H.Kier: An evaluation of tetracycline-fluorescence test in the diagnosis of gastric cancer. - Comparison with cytology. Ann.Int.Med.(Lancaster) 61: 56 (1964).
- Dina, M.A., e R.Pozzuoli: L'uso della tetraciclina como fluorocromo ed applicazioni alla diagnostica oncologica. Minerva Medica (Torino) 55: 3467 (1964).
- Donsky, H.J.: Tetracycline fluorescence in squamous cell carcinoma. Arch.Dermat. 92: 388 (1965).
- Du Buy, H.G., and J.L. Showacre: Zitiert bei Worsley.
- Duggar: Zitiert bei Velázquez, B.L.
- Druckrey, H., Preussmann, R., Ivankovic, S., und D.Schmähel: Organotrope Wirkung bei 65 verschiedenen N-Nitroso-Verbindungen an B-D-Ratten. Z.Krebsforschg. 69: 103 (1967).
- Eger: Zitiert bei Velázquez, B.L.
- Engelbart, K., Gerike, D., und A.Söder: Tierexperimenteller Beitrag zur Frage der Einlagerung von Tetracyclin im Tumorgewebe.

- Z.Krebsforschg. 66: 310 (1964).
- Frost, H.M., Villaneuva, A.R., and H.Roth: Tetracycline staining of newly forming bone and mineralizing cartilage in vivo.
Stain Techn. 35: 135 (1960).
- Finland: Zitiiert bei Velázquez, B.L.
- Ghadially, F.N.: Red fluorescence of experimentally induced and human tumors.
J.Path.Bact. 80: 345 (1960).
- Gouazé, A., Castaing, J., Rouzaud, M., M.Salles, J.J.Santini et P.Jobard: La fluorescence induite par les tetracyclines dans les tumeurs intracrâniennes.
Neuro-Chirurg.(Paris) 11: 217 (1965).
- Gougerot, H., and A. Patte: Bull.Soc.franc.Derm.Syph. 46: 288 (1939).
- Haitinger, M.J., und H.Hamperl: Die Anwendung des Fluoreszenzmikroskops zur Untersuchung tierischer Gewebe.
Ztschr.Mikrosk.-anat.Forsch. 33: 193 (1933).
- Häkkinen, I., and K.Hartiala: Fluorescence of tetracycline in experimental ulcers and regenerating tissue injuries.
Ann.med.exper.biol.Fenniae 37: 115 (1959).

- Hamperl, H., and N. Schümmelfeder: Some aspects of fluorescence microscopy. CIBA Symposium 9: 50 (1961).
- Helander, S., and L.E. Bottinger: On distribution of terramycin in different tissues. Acta med.Scand. 147: 71 (1953).
- Herley, L.: Studies in selective differentiation of tissues by means of filtered ultraviolet light. Cancer Res. 4: 227 (1944).
- Kern, G., Schümmelfeder, N., und E.Kern-Bontke: Die Acridinorange-Fluorochromierung in der Cytodiagnostik von Carcinomata in situ und Collumcarcinomen. Arch.Gynäk. 196: 394 (1961).
- Klinger, J., and R.Katz: Tetracycline fluorescence in diagnosis of gastric carcinoma. Gastroenterology 41: 29 (1961).
- Kuemmerle, H.P., und H. Contzen: Experimentelle Studie zum Verteilungsproblem der Antibiotica (Tetracyclinderivate) und neuerer Sulfonamide im pathologisch veränderten Gewebe des Menschen. Chemotherapia (Basel) 4: 535 (1962).
- Lacko, L., Korinek, J., and M. Burger: Zitiert bei Worsley, G.H.

- Lipson, R.L., Baldes, E.J., and A.M.Olsen: Hematoporphyrin derivate: A new aid for endoscopic detection of malignant disease. J.Thoracic.Cardiovas.Surg. 42: 623 (1961).
- Lipson, R.L., Baldes, E.J., and A.M.Olsen: The use derivative of hematoporphyrin in tumor detection. J.nat.Cancer Inst. 26: 1 (1961).
- Malek, P., Kolc, J., Zák, F., and V.Zástava: New aspects of tetracycline analogues distribution and fixing on pathologically changed tissue. Chemotherapia (Basel) 5: 269 (1962).
- McLeay, J.F.: The use of systematic tetracyclines and ultraviolet in cancer detection. A preliminary report. Amer.J.Surg. 96: 415 (1958).
- McLeay, J.F., and B.R. Walske: Tetracycline fluorescence in bone lesions. J.Bone Surg. 42-A: 940 (1960).
- Milch, R.A., Tobie, J.E., and R.A.Robinson: A microscopic study of tetracycline localization in skeletal neoplasms. J.Histochem. 9: 261 (1961).

- Milch, R.A., Rall, D.P., and J.E. Tobie: Bone localization of the tetracyclines.
J.nat.Cancer Inst. 19: 87 (1957).
- Moore, G.E.: Fluorescein as an agent in the differentiation of normal and malignant tissues.
Science 106: 130 (1947).
- Neves e Castro, M.: Influence du formol sur le phénomène de la fluorescence primaire des tissus. Étude histospectrographique.
Compt.rend.Soc.biol. 51: 1473 (1957).
- Phillips, J.W., Cobb, E.G., Richards, V., Rhodes, W.D., Loehrer, D.C., and J.L. Ritchie: The deposition and retention of tetracycline in cancer.
Amer.J.Surg. 100: 384 (1960).
- Policard, A.: Zitiiert bei Ghadially, F.N.
- Rall, D.P., Loo, T.L., Lane, M., and M.G. Kelly: Appearance and persistence of fluorescent material in tumor tissue after tetracycline administration.
J.nat.Cancer Inst. 19: 79 (1957).
- Saltzman, A.: J.Lab.Clin.Med. 35: 123 (1950).
- Sandlow, L.J., Allen, H.A., and H. Necheles: The use of tetracycline fluorescence in the detection of gastric malignancy.

- Sandlow, L.J., and H. Necheles: Ann.Int.Med. 58: 409 (1963).
Tetracycline fluorescence and cytological procedures compared for the detection of malignancy. J.Brit.Soc.Gastro-enterology GUT 7: 640 (1966).
- Schmähl, D., und C. Thomas: Die akute Vergiftung der Ratte mit Nitrosomethylurethan nach oraler Applikation. Arzneimittelforsch.12: 585 (1962).
- Sherman, H.H., Chryssanthou, C., Sukoff, M.H., Mininberg, D., Beckman, E.M., and M.Weingarten: Tetracycline fluorescence in the diagnosis of gastric carcinoma. Gastroenterology 45: 84 (1963).
- Tapp, E., Carroll, R., and K.Kovács: Tetracycline fluorescence in experimental tumors. Brit.J.Cancer 19: 538 (1965a).
- Tapp, E., Carroll, R., and K.Kovács: Tetracycline fluorescence in experimental renal lesions. Arch.Path. (Chicago) 79: 629 (1965b).
- Tapp, E., Kovács, K., and R.Carroll: Tetracycline staining of tissues in vitro. Stain Technol. 40: 199 (1965c).

- Tapp, E., Kovács, K.,
and R.Carroll: Tetracycline fluorescence in experimental lesions of the adrenal gland.
J.Path.Bact. 91: 241 (1966).
- Thomas, C.: Zur Morphologie der durch Diäthyl nitrosamin erzeugten Leberveränderungen und Tumoren bei der Ratte.
Z.Krebsforsch. 64: 224 (1961).
- Vassar, P.S., Saunders, A.M., and C.F.A.Culling: Tetracycline fluorescence in malignant tumors and benign ulcers.
Arch.Path. (Chicago) 69: 613 (1960).
- Velázquez, B.L.: Terapéutica con sus fundamentos de farmacología experimental. 9.edición.Edit.Científico-Médica, Barcelona,Madrid,Lisboa, Río de Janeiro (1963).
- Worsley, G.H., McKenna, R.D., and I.T.Beck: Critical evaluation of the tetracycline fluorescence test in the diagnosis of gastric carcinoma.
Canad.Med.Ass.J. 88: 1272 (1963).
- Yabe, Y., Warren, I.A., Berk, J.E., and S.D. Kobernick: Tetracycline fluorescence in mouse gastric carcinoma.
J.Histochem.Cytochem.12: 842 (1964).

Herrn Professor Dr. H. H a m p e r l und
Herrn Privatdozent Dr. C. T h o m a s danke
ich ergebenst für die liebenswürdige Überlas-
sung des Themas und die stete Hilfe und Bera-
tung bei der Abfassung der vorliegenden Arbeit.

LEBENS LAUF

Am 18. März 1935 wurde ich als das 8. Kind des Kaufmanns Nicolás Sierra Sierra und seiner Ehefrau Blanca Callejas de Sierra in Bello (Kolumbien) geboren.

In Medellín (Kolumbien) besuchte ich 5 Jahre die Volksschule und 6 Jahre die Oberschule, wo ich in Marinilla (Kolumbien) am 20.11.1954 die Reifeprüfung ablegte.

Im Jahre 1955 machte ich 10 Monate Militärdienst, um anschließend das Studium der Medizin im Oktober 1955 in Granada (Spanien) zu beginnen. Im Oktober 1957 setzte ich meine Studien in Madrid fort und beschloß sie am 2.11.1961 in Salamanca (Spanien) mit dem Staatsexamen mit der Note "sehr gut" ("Sobresaliente"). Anschließend besuchte ich noch ein Jahr lang den Doktorandenkurs in Salamanca. Gleichzeitig war ich in den Jahren 1961-1963 als Assistent am Pathologischen Institut der Universität Salamanca und arbeitete dort in der experimentellen Pathologie.

Von Oktober 1963 bis Februar 1964 besuchte ich einen Kursus des Goethe-Institutes in Staufeu/Breisgau, um mich auf meine Tätigkeit in Deutschland vorzubereiten. Vom 1. März 1964 bis Juli 1964 war ich als Volontär-Assistent am Pathologischen Institut der Universität Bonn tätig. Vom August 1964 bis jetzt bin ich als Wissenschaftliche Hilfskraft am Pathologischen Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn angestellt.

